

# アラキドン酸に特異的な新しいラット脂肪酸活性化酵素の構造と性質

著者	姜 萬鍾
号	522
発行年	1995
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16759">http://hdl.handle.net/10097/16759</a>

氏 名(国籍) <sup>カン</sup>姜 <sup>マン</sup>萬 <sup>ベン</sup>鍾

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 博 第 5 2 2 号

学位授与年月日 平 成 8 年 3 月 26 日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院農学研究科  
(博士課程) 農芸化学専攻

学 位 論 文 題 目 アラキドン酸に特異的な新しいラット脂  
肪酸活性化酵素の構造と性質

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 山 本 徳 男  
教 授 水 野 重 樹  
教 授 一 島 英 治

# 論文内容要旨

## 第1章 序論

脂肪酸活性化酵素 (acyl-CoA synthetase, EC 6.2.1.3, ACS) は ATP の存在下で、脂肪酸とコエンザイム A を結合させ、アシル CoA の生成を触媒する。本酵素は脂肪酸代謝の初発反応を担っている。ほ乳動物では脂肪酸生合成酵素の最終産物は遊離の脂肪酸であるため、脂肪酸は本酵素により活性化されない限り、代謝利用されない。本酵素によって生成されるアシル CoA は、幅広い反応系で利用される重要な代謝中間体である。ミトコンドリア、ペルオキシソームでアシル CoA は主としてベータ酸化系により分解され、小胞体では主としてトリグリセリド、リン脂質やコレステロールエステルなどの脂質合成に利用される。

特に、アラキドン酸代謝においては ACS は重要な役割を担っている。可溶性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> より遊離したアラキドン酸の一部は生物活性の高いプロスタグランディンやロイコトリエンに変換される。しかしながら大部分のアラキドン酸は ACS によりアラキドノイル CoA に変換され、さらにリン脂質に再エステル化される。このメカニズムによりアラキドン酸の細胞内プールは極めて低く保たれている。

私たちは今までに3つの ACS の構造を明らかにしてきた。ACS1 と名付けた ACS は最もよく解析された古典的な酵素で、肝臓や心臓、脂肪組織に特に高く発現する。これ以外に、脳に特異的な酵素 BACS1, 2 が cDNA クローニングにより明らかにされた。3つの ACS は共通して光コメツキ・ルシフェラーゼと相同する領域が2カ所存在する。ACS1 と BACS1 は構造も脂肪酸特異性も類似しているが、BACS2 は大きく異なっている。BACS2 はエイコサペンタエン酸、アラキドン酸、ミリストレイン酸などの不飽和脂肪酸とミリスチン酸とラウリン酸などの飽和脂肪酸を最もよく利用し、パルミチン酸に最も高い特異性を示す ACS1 とは大きく異なっている。

このような基質特異性から、BACS2 はエイコサノイド前駆体の代謝に重要と考えられた。BACS2 は脳に圧倒的に高く発現し、他の組織にはほとんど検出さ

れない。アラキドン酸は脳以外の組織でも活発に代謝されるので、私たちは脳以外にもBACS2に類似した酵素が存在すると予測し、ラット肝臓から新しいACS cDNAを単離した。

本研究では、ACS2と名付けたアラキドン酸とエイコサペンタエン酸に特異的なACSの構造、組換え体酵素の性質と細胞内局在性を明らかにすることを目的としている。

## 第2章 ACS2 cDNAのクローニング

BACS2をプローブとして用いて、ラット肝ライブラリーをスクリーニングする事によりACS2 cDNAを単離した。cDNAの塩基配列はエキソヌクレアーゼIIIを用いて作製した一連の欠損体をジデオキシシークエンシングすることにより決定した。

クローニングされたcDNAは開始コドンATGから2010塩基、670アミノ酸の蛋白質をコードしていた(Fig.1)。アミノ酸配列から計算された分子量は74,325で、他の3つのACSより最も小さい分子量を有していた。ACS2はBACS2のN末50アミノ酸に相当する部分がなく、これを除くと2つの酵素間で67.4%のアミノ酸同一性があった(Fig.2)。また、他のACS同様に2つのルシフェラーゼ類似領域を有していた。

ACS2 mRNAはBACS2とは大きく異なり、幅広い組織に分布している。特に、副腎に最も高く発現し、副睾丸周囲脂肪組織、脳、肺、肝臓の順に高い発現が見られた(Fig.3)。

サザンブロッティングによる遺伝子解析の結果、ACS2はX-染色体に存在することが示された(Fig.4,5)。

## 第3章 ACS2の精製と酵素学的性質

ACS2 cDNAをFig.6に示すようにPCRを用いて、lacプロモーターと結合させ、ACS2発現ベクターを構築した。この発現ベクターを有する大腸菌は

IPTGによりACS活性が顕著に誘導された(Fig.7)。

ACS2の酵素学的性質を明らかにするため、大腸菌から組換え体酵素を精製した。組換え体酵素はトライトンX-100で可溶化して、レッド・トヨパールとブルー・トヨパールを用いて単一まで精製した(Fig.8,9)。精製倍率は約32倍で回収率は20%であった。最終精製標品は比活性が21.2Uで、今まで精製されたACS標品とほぼ同一の比活性を有していた(Table.1)。

Fig.10に精製酵素のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を示した。精製酵素は約74kDaの単一バンドとして検出された。精製酵素の分子量はcDNAから計算された分子量とほぼ一致している。酵素標品の至適pHは7.5~8.0であった。

Fig.11にACS2の脂肪酸特異性をパルミチン酸の比活性を100とした相対活性で示した。ACS2はアラキドン酸とエイコサペンタエン酸を最も良い基質としこれらの脂肪酸に対する相対活性はパルミチン酸に対して約2倍であった。リノール酸とステアリン酸はパルミチン酸とほぼ同じ相対活性を示した。

ACS2の基質特異性を反応速度論的に解析した。アラキドン酸、エイコサペンタエン酸とパルミチン酸に対するKm値をTaylor展開を併用した最小自乗法により算出した。アラキドン酸とエイコサペンタエン酸に対するVmax/Kmはそれぞれパルミチン酸を用いた場合の3.96倍と2.81倍であった(Table.2)。この結果より、ACS2はアラキドン酸とエイコサペンタエン酸に対して高い親和性を有する事が明らかになった。

#### 第4章 ACS2の細胞内局在性の解析

ACS2に対する抗体を作製し、これを用いてACS2の細胞内局在性を解析した。

精製酵素を8%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、精製酵素を含むゲルをACS2抗原として用いた。ゲルを細く砕いて、アジュバントと混合し、ウサギに免疫する事によって抗体を作製した。Hi Trap

Protein Aカラム(Pharmacia Biotech)を用いて抗血清よりIgG画分を精製して用いた。

抗体の特異性はACS2を発現するCOS細胞の抽出液を用いて解析した。抗ACS2抗体によりACS2を発現するCOS細胞に74 kDaのバンドが検出された。これに対し、ACS1, BACS1と2を発現するCOS細胞には抗ACS2抗体と交差する蛋白は検出されなかった。これより、抗ACS2抗体はACS1, BACS1, BACS2及びCOS細胞の内因性ACSを認識しないことが明らかになった。また本研究室の飯島と藤野によって作られた抗ACS1、抗BACS1と抗BACS2抗体もACS2を認識しないことが示された(Fig. 12)。

細胞分画法を用いて、ACS2の細胞内局在性を解析した。細胞分画は正常とペルオキシゾーム誘導剤であるDEHP[Di-(2-ethyl hexyl)phthalate]を投与したラットの肝臓を用いてOsumiとHashimotoの方法に従った。遠心法により核画分、重いミトコンドリア画分、軽いミトコンドリア画分、ミクロソーム画分と可溶性画分を分離した。分離されたミトコンドリア、ペルオキシゾームとミクロソーム画分のマーカー酵素としてそれぞれグルタミン酸デヒドロゲナーゼ、カタラーゼとグルコース-6-ホスファターゼ活性を測定した。軽いミトコンドリア画分中のペルオキシゾームとミトコンドリアを分離するためにショ糖密度勾配遠心分離法を行った。ペルオキシゾーム画分は45.8%と53.9%ショ糖溶液の間に、ミトコンドリア画分は37.4%と45.8%の間に回収された。

ミトコンドリア画分、ペルオキシゾーム画分及びミクロソーム画分の純度はマーカー酵素活性を測定することによって確認した。分離した各画分のタンパク質150  $\mu$ gを免疫ブロッティングにより解析した。その結果Fig. 13に示すようにミトコンドリア画分、ペルオキシゾーム画分とミクロソーム画分に74 kDaのバンドが検出された。正常ラット・ペルオキシゾーム画分の74 kDaを1とした場合、ミトコンドリア画分の74 kDaは5.7、ミクロソーム画分は3.1の相対値を示した。DEHPを投与したラットのミトコンドリアとミクロソーム画分の相対値はペルオキシゾーム画分に

対してそれぞれ2.7と2.6であった。ペルオキシゾーム画分の74 kDaタンパク質は正常ラットに比べDEHPを投与したラットでは約3.3倍強く検出された。これらの結果よりACS2はACS1と同様にミトコンドリア、ペルオキシゾーム、ミクロソームに局在する事が示唆された。

## 第5節 要約

本研究によりアラキドン酸に特異性の高い新しいACSが証明された。ACS2は670アミノ酸からなり、分子量は74,325と計算された。また、他の3つのACS同様にルシフェラーゼ類似領域を2つ有していた。ACS2はACS/ルシフェラーゼファミリー中でBACS2と最も類似していることが示された。ACS2 mRNAは副腎に最も高く発現し、副睾丸周囲脂肪組織、脳、肺、肝臓にも検出された。遺伝子解析により、ACS2の遺伝子はラット、マウス、ヒトのX-染色体に存在することが明らかになった。

ACS2はアラキドン酸とエイコサペンタエン酸に最も高い特異性を示し、反応速度論的にもアラキドン酸とエイコサペンタエン酸に対して高い親和性が示された。ACS2は肝臓のミトコンドリア、ペルオキシゾーム、ミクロソーム画分に存在する事が示された。

### 参考論文

Fujino, T., Kang, M-J., Suzuki, H., Iijima, H., and Yamamoto, T., (1995) Brain acyl-CoA synthetase 2 : I. Molecular characterization and developmental regulation of a novel brain acyl-CoA synthetase that activates arachidonate, eicosapentaenoate and myristate with high efficiency. J. Biol. Chem. Submitted.

Fujino, T., Iijima, H., Suzuki, H., Kang, M-J., and Yamamoto, T., (1995) Brain acyl-CoA synthetase 2 : II. Alternative translation initiation generates brain acyl-CoA synthetase 2 isoforms with heterogeneous amino termini. J. Biol. Chem. Submitted.



**Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of rat ACS 2.**

**Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences of rat ACS 2 and BACS 2.**

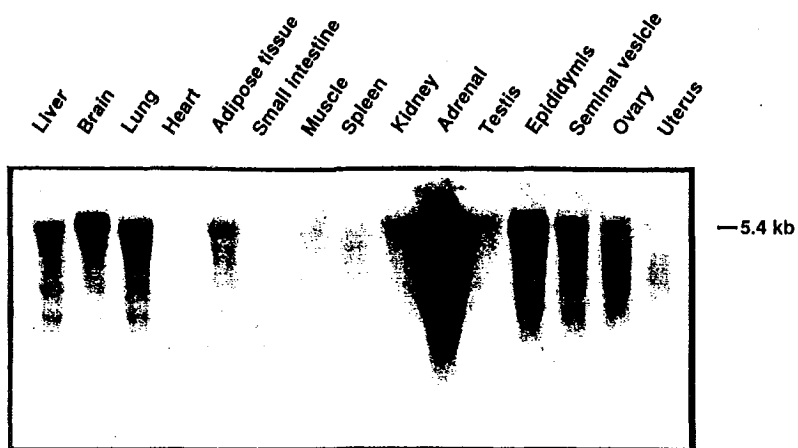


Fig. 3. Tissue distribution of rat acyl-CoA synthetase 2 mRNA.

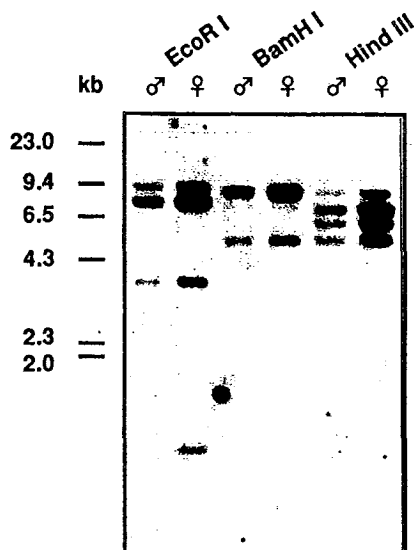


Fig. 4. Southern blot analysis of male and female rat genomic DNA.

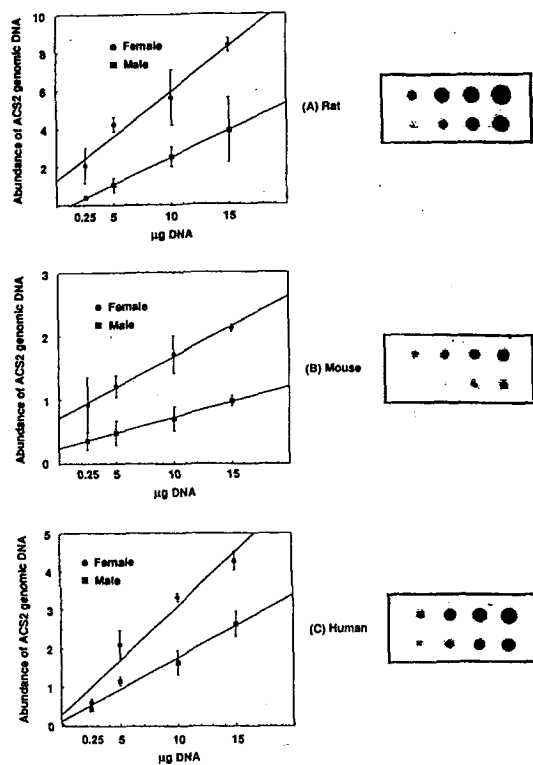


Fig. 5. Dot blot analysis of the rat, mouse and human genomic DNA.

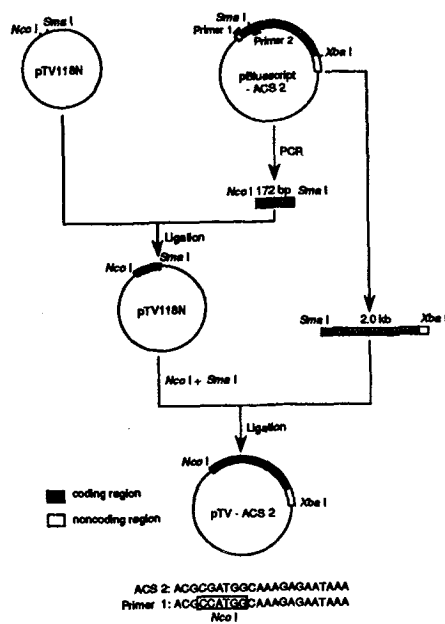


Fig. 6. Construction of rat ACS 2 expression vector.

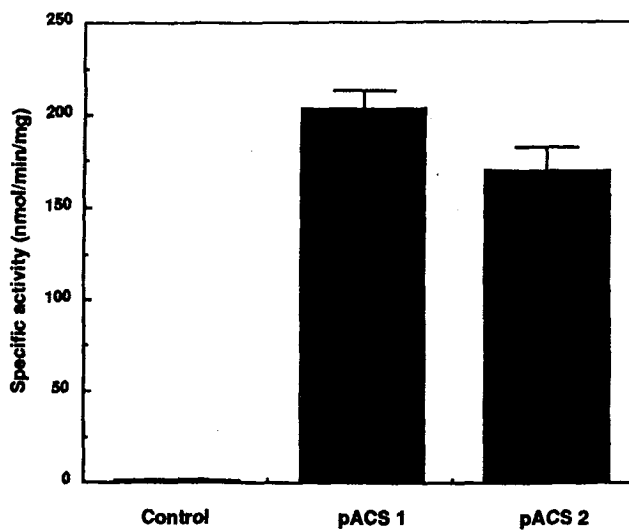


Fig. 7. Induction of ACS activities in *E. coli* XL1-blue.

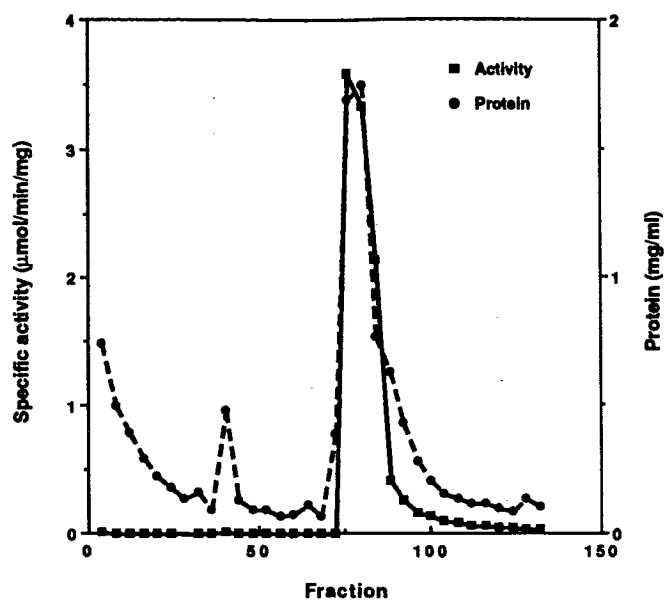


Fig. 8. Red-Toyopearl chromatography of recombinant rat acyl-CoA synthetase 2 from *E. coli* XL1-blue.

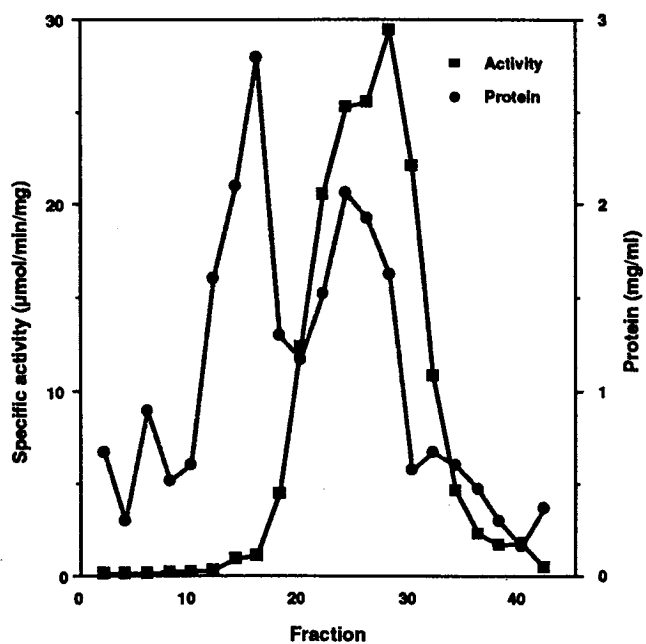


Fig. 9. Blue-Toyopearl chromatography of recombinant rat acyl-CoA synthetase 2 from *E. coli* XL1-blue.

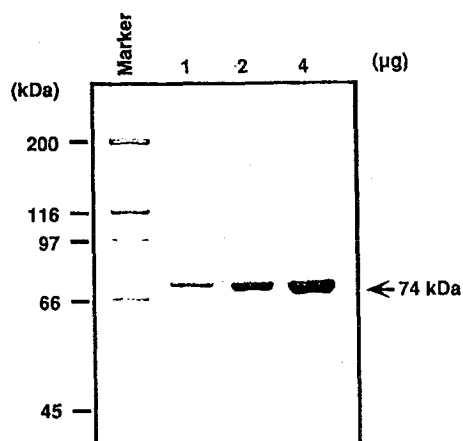
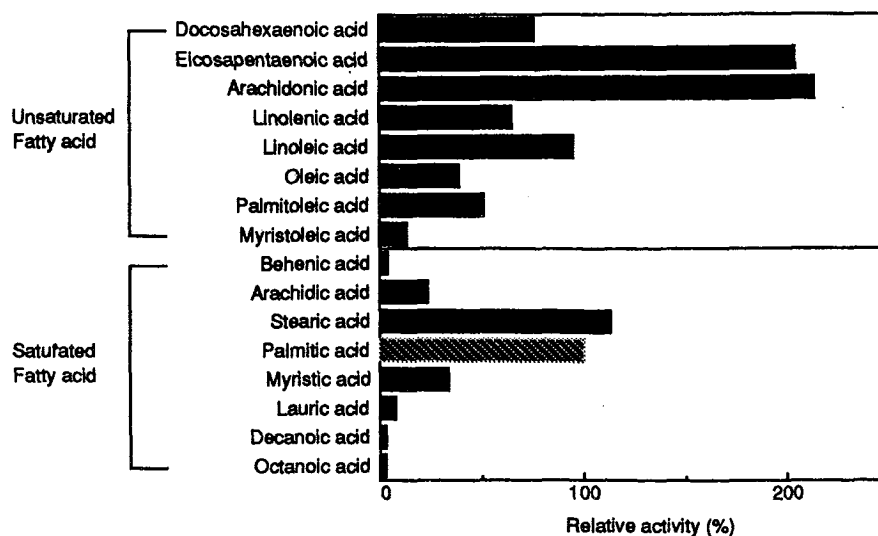


Fig. 10. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified recombinant acyl-CoA synthetase 2.

Table. 1. Summary of the purification of recombinant rat ACS 2 from *E. coli* XI1-blue

Fraction	Protein	Total activity	Specific activity	Purification	Yield
	mg	$\mu\text{mol/min}$ ( $\mu\text{kat}$ )	$\mu\text{mol/min/mg}$ ( $\mu\text{kat/kg}$ )	fold	%
Crude extract	1360	882.6 (14.71)	0.649 (10.8)	1	100
105,000xg sup.	1040	697.8 (11.63)	0.671 (11.2)	1.03	79.1
Red Toyopearl	144	629.7 (10.40)	4.373 (72.9)	6.74	71.4
Blue Toyopearl	8.4	177.6 (2.96)	21.145 (352.4)	32.58	20.1



**Fig. 11. Fatty acid specificity of recombinant rat acyl-CoA synthetase 2.**

**Table. 2. Kinetic properties of the purified recombinant rat ACS 2**

Substrate	$K_m$	$V_{max}$ (kcat)	$V_{max}/K_m$ (kcat/ $K_m$ )
	$\mu M$	$\mu mol/min/mg (sec^{-1})$	$(mM^{-1}s^{-1})$
Palmitic acid	$31.69 \pm 19.20$	$16.55 \pm 3.22 (4.6)$	$0.52 (0.145)$
Arachidonic acid	$20.10 \pm 8.29$	$41.46 \pm 4.99 (11.5)$	$2.06 (0.572)$
Eicosapentaenoic acid	$28.87 \pm 10.74$	$42.15 \pm 4.55 (11.7)$	$1.46 (0.405)$

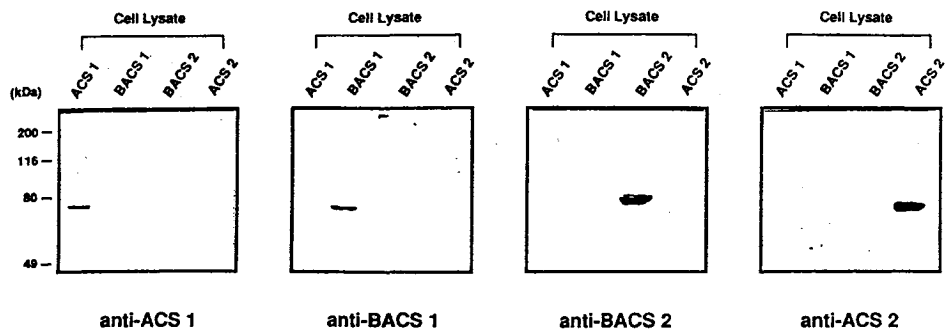


Fig. 12. Western blot analysis of acyl-CoA synthetases expressed in COS cell.

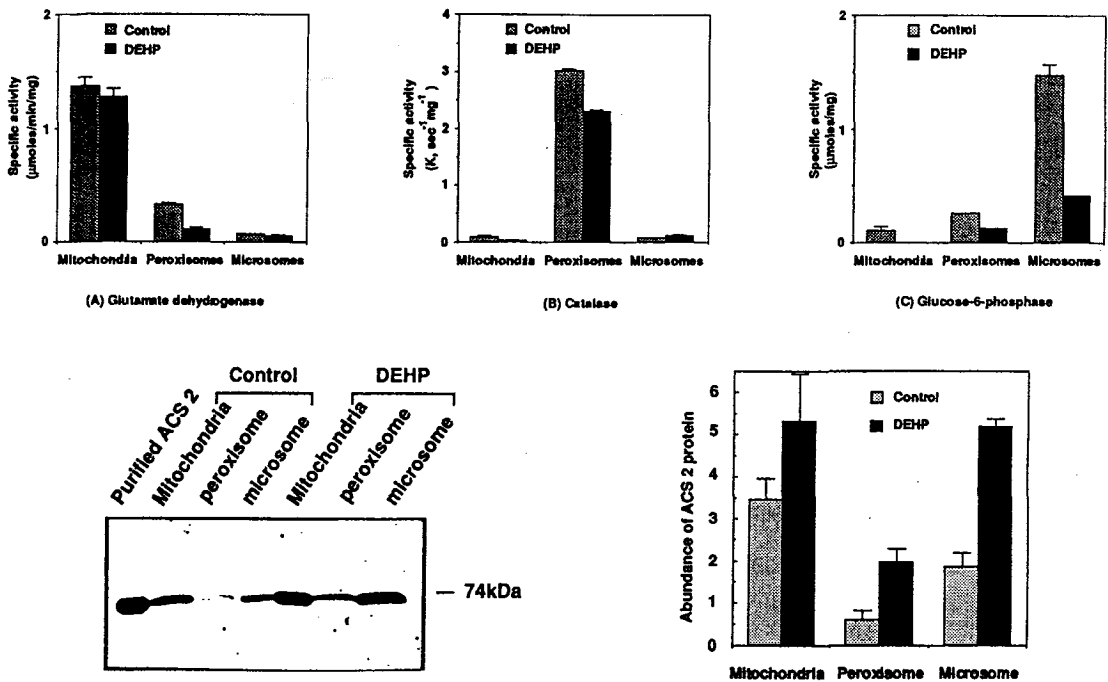


Fig. 13. Immunoblotting of acyl-CoA synthetase 2 in the subcellular fractions of rat liver.

## 論文審査の要旨

ホルモン、細胞増殖因子等の刺激により、可溶性ホスホリパーゼA<sub>2</sub>が活性化され、細胞膜のリン脂質からアラキドン酸が遊離し、生物活性の高いプロスタグランディンやロイコトリエンに変換される。可溶性ホスホリパーゼA<sub>2</sub>により遊離されるアラキドン酸の多くは脂肪酸活性化酵素によりアラキドノイルCoAに変換され、リン脂質に再エステル化される。このようなメカニズムの存在により、アラキドン酸から生理活性の高いプロスタグランディンやロイコトリエンの生成が調節される。このような役割を担うアラキドン酸特異的な脂肪酸活性化酵素の存在は長年示唆されてきたが、その実体は不明である。

本研究は、アラキドン酸とエイコサペンタエン酸に高い特異性を持つ新しい脂肪酸活性化酵素(ACS 2)をラットcDNAの単離により明らかにした。この酵素は副腎に最も高く発現し、副睪丸周囲脂肪組織、脳、肺、肝臓にも検出され、今までの脂肪酸活性化酵素とは異なった組織特異性をもつ酵素であることが示された。サザンブロッティングによりこの遺伝子はX-染色体にマップされ、この酵素の異常症の存在に興味を持たれる。大腸菌に大量発現させた組換え体酵素が精製され、反応速度論的解析から本酵素はアラキドン酸とエイコサペンタエン酸に対して高い親和性を有することが明らかになった。また、この酵素は細胞分画によってミトコンドリア、ペルオキシゾーム、ミクロソームの3つの画分に局在する事が示された。

本研究はこれまで明らかにされていないアラキドン酸特異的な脂肪酸活性化酵素の構造と性質を明らかにした。本研究はアラキドン酸の遊離により開始されるプロスタグランディン代謝の調節メカニズムを解明する上で画期的な結果をもたらした。よって、審査員一同は本論文提出者は博士(農学)の学位を受けるに値すると判定した。